

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ODAIR BRAZ JUNIOR

**EFEITO PROTETOR DO PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO DA AÇÃO
DO VENENO DE ARANHA-MARROM EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
CULTURA**

CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ODAIR BRAZ JUNIOR

**EFEITO PROTETOR DO PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO DA AÇÃO
DO VENENO DE ARANHA-MARROM EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM
CULTURA**

Trabalho apresentado como requisito parcial
à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina no
curso de graduação em Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coorientador: Msc. Gustavo Rodrigues Rossi

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade, por ter me ajudado em todas as etapas até o momento, com certeza tudo o que eu sei e tudo o que eu tenho eu devo a Ele, e sem Ele com certeza não estaria aqui.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais e meu irmão que apesar de todas as coisas sempre me incentivou e me ajudou no que eu precisava.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pela oportunidade de entrar no laboratório, pela confiança, ajuda, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Ao meu co-orientador Gustavo Rodrigues Rossi, que me ajudou em todas as etapas desse projeto, me ensinou as técnicas necessárias. Principalmente nos momentos em que chegava ao desespero, ele me mantinha no chão e não me deixou perder a calma em nenhum momento.

Ao colega de Laboratório João Luiz Aldinucci Buzzo, por todas as conversas filosóficas sobre a vida, e ter ouvido todas as piras que eu tive durante esse ano.

A todos os colegas de laboratório, por terem me ajudado quando tive alguma dúvida, e me aguentado todo esse período.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência pela disponibilização dos equipamentos e ajuda com as análises dos resultados obtidos. Aos funcionários Israel Henrique Bini e Lisandra Santos Ferreira-Maba, por todo o conhecimento que compartilharam comigo, e pela paciência que tiveram comigo no tempo que fiz estágio.

A CAPES pela bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

No estado do Paraná o loxoscelismo, acidente causado pela picada de aranha do gênero *Loxosceles* (popularmente conhecidas como aranha-marrom), é a principal ocorrência envolvendo animais peçonhentos no estado. Existem duas principais complicações envolvendo o loxoscelismo, a lesão cutânea (dermonecrose) e, em casos mais graves, uma ação sistêmica, podendo levar à falência renal. Na análise histológica da lesão cutânea, pode-se observar modificações na estrutura dos vasos sanguíneos, como vasodilatação, degradação da parede dos vasos e formação de trombos. No entanto, quando as células endoteliais “in vitro” são expostas às toxinas presentes no veneno, elas ficam arredondadas e soltam da placa de cultura, sem provocar efeito direto sobre as células, as quais acabam morrendo por *Anoikis* (apoptose desencadeada por desalojamento). Resultados preliminares sugerem que o proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) pode ser a molécula que leva à proteção das células endoteliais da ação direta do veneno de aranha-marrom. Para confirmar esse papel protetor foram realizados ensaios de morte celular e avaliação da morfologia das células. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram claramente que, de fato, o PGHS protege as células endoteliais, tendo em vista que a exposição ao veneno para a linhagem deficiente na produção do sindecam-4, um PGHS característico da célula endotelial, leva a ação direta sobre a célula, desencadeando um processo de necrose.

Palavras-chave: Loxoscelismo, Glicosaminoglicanos, Proteoglicano de Heparan Sulfato, Células Endoteliais.

ABSTRACT

Loxoscelism is the accident caused by brown spider's bite. It is the major event involving venomous animals in the state of Paraná. There are two main complications in loxoscelism: cutaneous wound (dermonecrosis), and in serious cases systemic symptoms, leading to kidney failure. Analyzing the histopathological lesion, some alterations in the structure of blood vessels are present, such as vasodilation, degradation of endothelium and thrombosis. Those alterations may occur due to the loss of cellular adhesion. Literature data, demonstrate that heparan sulfate proteoglycan (HSPG), may have a protective effect in endothelial cells when exposed to the brown spider's venom. The aim of this project is understand the mechanism which heparan sulfate proteoglycan exert the protective effect in endothelial cells exposed to the loxoscelic venom. Thus, for this purpose flow cytometry was used to evaluate cell's death process and light microscopy to evaluate morphological cellular alterations. The results showed that HSPG protect the endothelial cells whereas analyzing a Syndecan-4 knockdown endothelial cell, the brown spider venom have a direct action in the cell, leading to a death by necrosis.

Keywords: Loxoscelism. Glycosaminoglycans. Heparan Sulfate Proteoglycan. Endothelial Cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. LOXOSCELISMO	8
2.2. ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i>	9
2.3. VENENO DAS ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES	10
2.3.1. CARACTERÍSTICAS DO VENENO	10
2.3.2. EFEITO DO VENENO NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS	10
2.3.3. EFEITO DO VENENO NA MATRIZ EXTRACELULAR	12
2.4. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	13
2.4.1. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS	13
2.4.2. HEPARAM SULFATO	15
2.4.3. PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO	16
2.4.4. PAPEL PROTETOR DOS GLICOSAMINOGLICANOS EM RELAÇÃO AO VENENO DA ARANHA-MARROM	17
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. OBTENÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO	18
4.2. CULTIVO CELULAR	18
4.3. AUMENTO DA EXPRESSÃO DO PGHS	19
4.4. ANÁLISE DE MORTE CELULAR	19
4.5. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO VENENO SOBRE A MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. EFEITO DO VENENO DA ARANHA NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS	20
5.2. ANÁLISE DE MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS AO VENENO DA ARANHA-MARROM	22

5.3. ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA PROVOCADA PELO VENENO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DEFICIENTES DA EXPRESSÃO DE PGHS.....	24
5.4. ANÁLISE DE MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS COM DEFICIÊNCIA NA EXPRESSÃO DE SINDECAM-4.....	25
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	27
7. CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O loxoscelismo é o principal quadro clínico envolvendo aranhas peçonhentas no estado do Paraná. De acordo com o Ministério da Saúde/DATASUS, no ano de 2013 e 2014 foram relatados 4.168 e 4.354 ocorrências envolvendo as aranhas-marrom no estado, respectivamente (Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são reclusas, e preferem o ambiente noturno para a caça, e nessa busca podem acabar se escondendo nos calçados e roupas dos seres humanos. Os acidentes ocorrem, por exemplo, quando ao calçar ou vestir a aranha é comprida contra a pele (PACE; VETTER, 2009; VETTER, 1999).

Estudos do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que células endoteliais de aorta de coelho, quando expostas ao veneno loxoscélico, perdem adesão celular, com consequentemente desalojamento e morrem por *anoikis* (morte celular pela perda do contato) (NOWATZKI et al., 2012). Além disso, polissacarídeos sulfatados (heparina e fucanas) tem se mostrado possíveis candidatos em exercer um efeito protetor nas células endoteliais, frente ao veneno de aranha-marrom (SENE, 2009). Esses dados, associados ao fato de que o Proteoglicano de Heparan Sulfato (PGHS) presente nas células endoteliais possui na sua porção sacarídica, sequências de dissacarídeos característicos da molécula de heparina (ricos em ácido idurônico, 2-O-sulfatado) intercalados entre dissacarídeos característicos da molécula de heparan sulfato, faz com que seja conhecido como um copolímero de heparan sulfato e heparina (Nader et al., 1987). Portanto, sugerem que seja esse PGHS a molécula que protege as células endoteliais da ação do veneno.

Tendo como base esses estudos, o presente projeto visa avaliar o real envolvimento de PGHS como possível protetor do efeito da ação do veneno loxoscélico sobre as células endoteliais em cultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LOXOSCELISMO

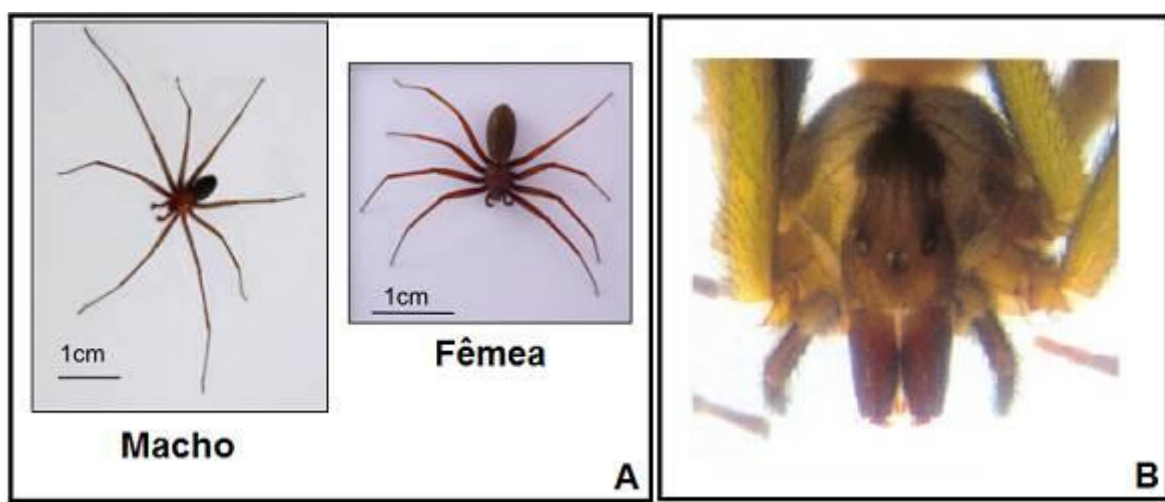
Loxoscelismo é o acidente causado pela picada das aranhas do gênero *Loxosceles* (CHAVES-MOREIRA et al., 2017., BARBARO et al., 1992. Geralmente o quadro clínico desse acidente é marcado por uma lesão dermonecrotica, porém em alguns casos pode evoluir para uma lesão sistêmica (BARBARO et al., 1992). Também pode ocorrer uma manifestação sistêmica do loxoscelismo, sem ocorrer a

formação de uma lesão dermonecrótica (DA SILVA et al., 2004). Esse quadro clínico já foi reportado em praticamente todos os continentes (BEDNASKI et al., 2015). A observação histopatológica da lesão dermonecrótica, apresenta várias alterações em relação ao quadro normal, como por exemplo, mostrado pela formação de trombos, hemorragia, com o extravasamento de hemácias, células inflamatórias e necrose liquefativa (DA SILVA et al., 2004; SAMS et al., 2001). Menos comumente, a lesão dermonecrótica pode evoluir para efeitos sistêmicos, causando vômitos, falência renal podendo levar a morte (BARBARO et al., 1992; DE OLIVEIRA et al., 2005; GREMSKI et al., 2014).

2.2 ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* também são conhecidas como aranhas-marrom, devido a sua coloração variando do marrom claro ao marrom escuro, ou aranhas violino, por apresentar em seu cefalotórax uma forma semelhante ao violino (DA SILVA et al., 2004). Essas aranhas possuem seis olhos distribuídos em pares, em um arranjo formando a letra “U”, sendo essa distribuição importante para a taxonomia (VETTER, 1999). Também possuem dimorfismo sexual, sendo os machos com o abdômen menor e as patas mais alongadas e as fêmeas com o abdômen maior do que o dos machos e patas mais curtas (CHAVES-MOREIRA et al., 2017; GREMSKI et al., 2014) (FIGURA 1). As aranhas-marrom não são agressivas e, na maior parte das vezes, só atacam quando se sentem ameaçadas e preferem ficar em locais escuros (FUTRELL, 1992).

FIGURA 1: ARANHAS DO GÊNERO *LOXOSCELES*



A - Dimorfismo Sexual presente na espécie *Loxosceles intermedia*. **B** – Arranjo dos 6 olhos presentes na espécie em formato de U. FONTES: (A) APPEL et al., 2005; (B) SWANSON; VETTER, 2006)

Existem aproximadamente 100 espécies descritas do gênero *Loxosceles* e encontram-se distribuídas principalmente nas Américas, nas Índias Ocidentais e na África (BINFORD et al., 2008), sendo 11 espécies encontradas no Brasil (SILVEIRA, 2015), e pelo menos 3 tem importância médica, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (DE OLIVEIRA et al., 2005).

2.3. VENENO DAS ARANHAS DO GÊNERO LOXOSCELES

2.3.1. CARACTERÍSTICAS DO VENENO

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido amplamente estudado e várias toxinas vêm sendo descritas (CHAIM et al., 2011). Acredita-se que o veneno tenha a função de paralisar e matar a presa, e a cada picada o volume de veneno injetado é pequeno, aproximadamente 4 µL contendo entre 65 e 100 µg de proteína (SAMS et al., 2001).

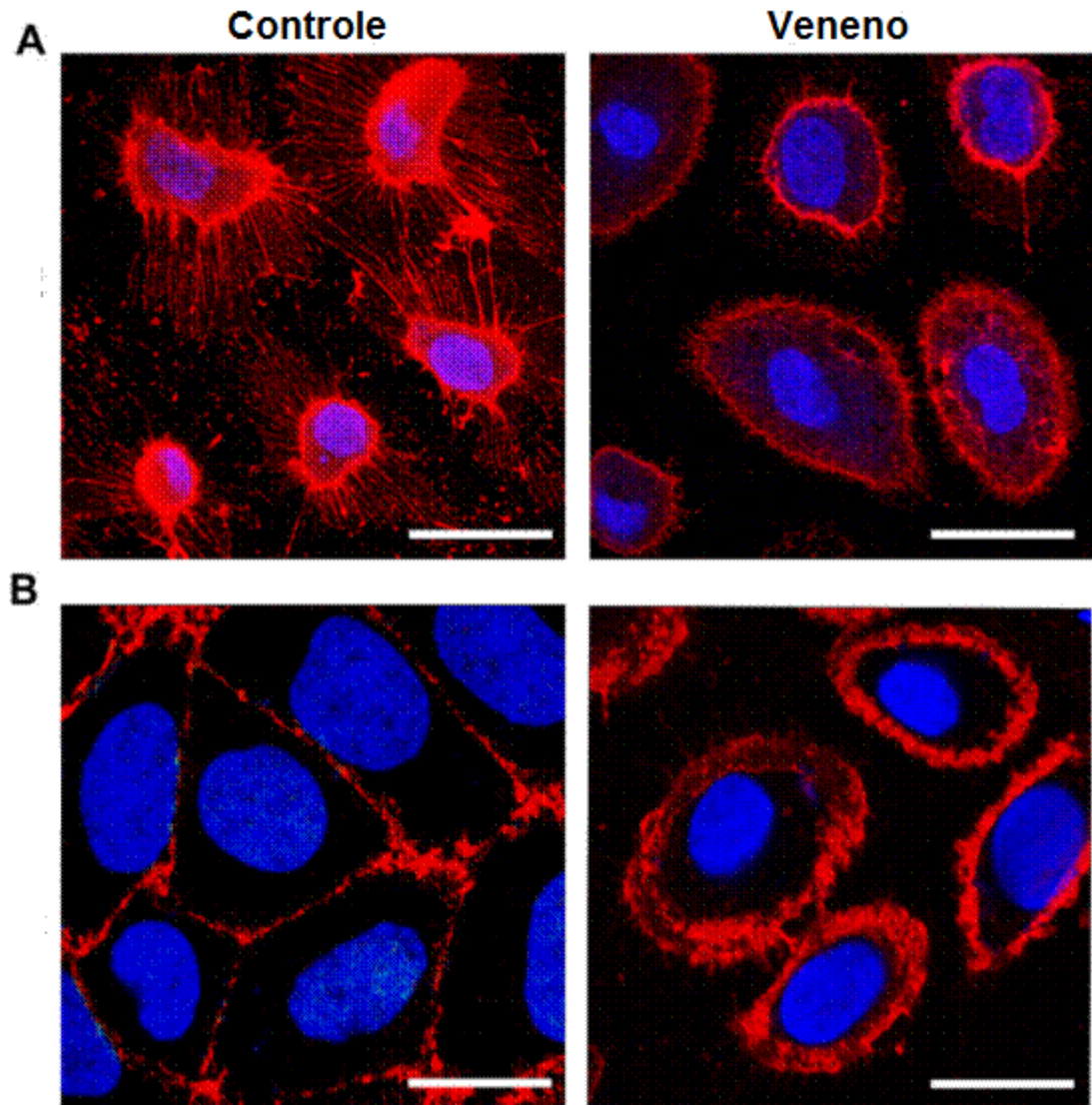
O veneno é uma mistura de compostos que variam de 1 a 40 kDa, sendo incolor e cristalino, contendo principalmente, fosfolipases-D, metaloproteinases, hialuronidases, serinoproteases e peptídeos inseticidas (CHAIM et al., 2011). A principal classe de toxina responsável pela dermonecrose é a classe das fosfolipases-D hidrolisando a esfingomielina em ceramida-1-fosfato (FUTRELL, 1992). Segundo Machado (2005 apud GREMSKI et al., 2014) 11 isoformas dessa enzima são encontradas no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles*.

2.3.2. EFEITO DO VENENO NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Veiga e colaboradores, em 2001, investigaram o efeito da exposição das células endoteliais da aorta de coelho ao veneno da aranha-marrom em cultura. Após 18 horas de exposição observaram que 95% das células apresentam morfologia arredondada e ficavam em suspensão. Curiosamente, quando essas células em suspensão foram replaqueadas (em novo meio, na ausência do veneno), apresentavam características iguais às células controle, com viabilidade igual ou superior a 95% (avaliadas após 72 horas de cultivo). Esses experimentos sugeriram que nas células endoteliais o veneno da aranha-marrom não provoca morte celular

direta, mas apenas rompe a adesão celular (VEIGA et al. 2001a). Paludo e colaboradores (2006) mostraram que essas células na presença do veneno da aranha-marrom, perdem a adesão célula-célula e célula-matriz, principalmente a fibronectina. Posteriormente, Nowatzki e colaboradores (2012), evidenciaram que após a desadesão, as células endoteliais entram em processo de *anoikis* (apoptose pela perda de contato), isto é, a morte celular não era causada pela ação direta do veneno, mas uma consequência do desalojamento causado pela clivagem de suas proteínas da matriz extracelular. Consequentemente, também foram observadas mudanças na morfologia das células, sendo que o aspecto celular deixou de ser um arranjo espraído e passou a ter um aspecto arredondado, evidenciando a perda do contato célula-célula e célula-matriz (Figura 2).

FIGURA 2: EFEITO DO VENENO DA ARANHA-MARROM EM PROTEÍNAS DE ADESÃO CELULAR



(A) Imunomarcacão para detecção de Integrina $\alpha 5 \beta 1$ em vermelho, e núcleo evidenciado em azul pela coloração com DAPI. Pode-se observar uma diminuição do espreadimento dessa proteína. (B) Imunomarcacão de VE-Caderina em vermelho, e núcleo em azul (DAPI). Percebe-se que houve um arredondamento celular e a diminuição da interação célula-célula. Fonte: NOWATZKI et al., 2012

2.3.3. EFEITO DO VENENO NA MATRIZ EXTRACELULAR

Algumas enzimas presentes no veneno da aranha-marrom são capazes de degradar a matriz extracelular, atuando principalmente sobre a fibronectina e sobre o fibrinogênio encontrado no plasma (VEIGA et al., 2001b). Vários artigos na literatura, mostram que uma das complicações do loxoscelismo é a hemorragia (DIAS-LOPES et al., 2010; PACE; VETTER, 2009), e como a fibronectina e o fibrinogênio estão envolvidos no processo de recuperação tecidual (LENSELINK, 2015) e agregação plaquetária, respectivamente, a degradação dessas proteínas pode contribuir para estabelecer esse quadro hemorrágico (VEIGA et al., 2001b).

O veneno também possui efeito na membrana basal (um tipo de matriz extracelular especializada), que é constituída por várias classes de macromoléculas, como colágeno do tipo IV, perlecan (um tipo de proteoglicano de heparam sulfato), laminina, entre outros (PALUSSON, 1992). A degradação desses componentes da matriz extracelular pode contribuir para a ação dermonecrótica do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* (BARAMOVA et al., 1989; VEIGA et al., 2001b).

2.4. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

2.4.1. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS

Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares carregados negativamente compostos por uma repetição dissacarídica, contendo um açúcar aminado, sendo *N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina, e um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico), ou um açúcar neutro (D-galactose) (ESKO; KIMATA; LINDAHL, 2009; JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991). Os GAGs são, geralmente, encontrados covalentemente ligados à proteínas, formando os Proteoglicanos.

Os GAGs são classificados em: Condroitim Sulfato (CS), composto por D-glucurônico e *N*-acetil-D-galactosamina, pode ser sulfatado no carbono 4 ou 6 da galactosamina; Dermatom Sulfato (DS), composto por ácido L-idurônico e *N*-acetil-D-galactosamina, contendo grupamento sulfato no carbono 4; Queratom Sulfato (QS), composto de D-Galactose e *N*-acetil-D-glucosamina, pode ser sulfatada no carbono 6; Heparom Sulfato (HS) e Heparina, compostos por ácido D-glucurônico ou L-idurônico e *N*-acetil D-glucosamina; e Ácido Hialurônico (AH) composto por ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina. O AH é o único GAG que não forma um proteoglicano e não é sulfatado (KUBASKI et al., 2017; LEE; OH; CHUNG, 2016; LIMA; RUDD; YATES, 2017).

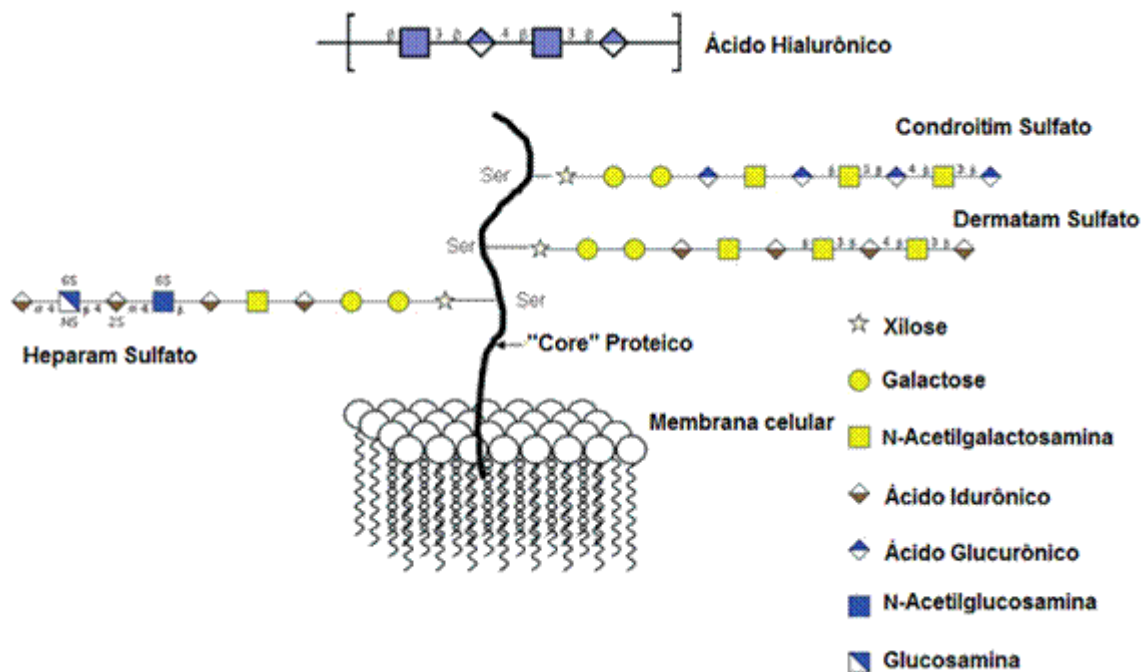
Esses compostos estão presentes em praticamente todos os animais e possuem diferentes funções, tais como: ligação à fatores de crescimento (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005); angiogênese (IOZZO; SAN ANTONIO, 2001); sinalização celular (POMIN, 2015; SCHAEFER; SCHAEFER, 2010), entre outras.

Recentemente os GAGs tem sido estudados como possíveis tratamentos alternativos em algumas patologias. Por exemplo, estudos com condroitim sulfato tem mostrado propriedades farmacológicas interessantes, tais como: antiviral (KATO

et al., 2010), indução da regeneração de dendritos (PAVELIEV et al., 2016). A Heparina, além do uso como anticoagulante desde a década de 50 do século passado, tem mostrado muitas outras propriedades, como tratamento de asma (SHASTRI et al., 2014), e doenças neurodegenerativas (MALAQUE et al., 2015), entre outras.

Proteoglicanos são formados por um esqueleto proteico que possuem GAGs ligados covalentemente em sua estrutura (COUCHMAN; PATAKI, 2012; SCHAEFER; SCHAEFER, 2010) (Figura 3). Praticamente todas as células animais produzem proteoglicanos, e esses compostos estão localizados na matriz extracelular, na membrana das células ou armazenados em vesículas (CHAVANTE et al., 2000; ESKO; KIMATA; LINDAHL, 2009; IOZZO; SCHAEFER, 2015; SCHAEFER; SCHAEFER, 2010).

FIGURA 3: ESTRUTURA GERAL DE UM PROTEOGLICANO



Pode se observar a estrutura básica de um proteoglicano com o seu "core" proteico, e os glicosaminoglicanos, ligados em sua estrutura (adaptado de GANDHI; MANCERA, 2008)

2.4.2. HEPARAM SULFATO

O heparan sulfato (HS) é um glicosaminoglicano constituído pela repetição de unidades dissacarídicas composta pela *N*-acetilglucosamina e um ácido urônico, podendo ser o ácido D-glucurônico ou o ácido L-idurônico. O HS possui variabilidade no grau de sulfatação, sendo que a *N*-acetilglucosamina pode ser *N*-sulfatada e/ou *O*-sulfatada, e o ácido L-idurônico pode apresentar um grupo 2-*O*-sulfato. Essas variações atribuem uma grande heterogeneidade na estrutura do HS (ESKO; SELLECK, 2002; JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991).

Por ter a sua estrutura variável, existe uma infinidade de moléculas que interagem com o HS, como proteínas, fatores de crescimento, citocinas, e enzimas (SARRAZIN; LAMANNA; ESKO, 2011). Dessa forma, o HS influencia diversas funções no organismo, como reconhecimento de moléculas, crescimento celular e angiogênese (IOZZO; SAN ANTONIO, 2001; LOPES; DIETRICH; NADER, 2006).

Raramente a estrutura do HS é encontrada solta nos organismos, mas encontra-se ligada a um "core" proteico, formando um proteoglicano (ESKO; LINDAHL, 2001). Porém, existem enzimas, como as "sheddases", que podem liberar o ectodomínio do PGHS tornando-os solúveis (BERNFELD et al., 1999). Quando esse processo ocorre, os ligantes de HS são liberados e podem causar aumento ou

diminuição do efeito desses compostos, promovendo uma alteração da resposta célula (BERNFELD et al., 1999). Outra classe de enzimas que degradam o HS são as heparanases (ILAN; ELKIN; VLODAVSKY, 2006), as quais degradam parcialmente as cadeias sacarídicas, liberando fragmentos de HS. A degradação das cadeias de HS presente na matriz extracelular promove o aumento de metástase em células cancerígenas, facilitando a passagem das células para outros tecidos (ILAN; ELKIN; VLODAVSKY, 2006).

2.4.3. PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO

O proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) está presente praticamente em todos os organismos multicelulares que possuem estruturação tecidual (SOARES et al., 2015). Existem basicamente duas classes de PGHS:

- Ligadas à membrana celular, como os glipicans e os sindecam;
- Presentes na matriz extracelular, como o perlecam, agrim e colágeno XVIII (SOARES et al., 2015).

Os PGHS de superfície celular podem estar ligados a membrana celular de duas maneiras: associado ao Glicosil-fosfatidilinositol (ancora de GPI), da família do glipicam, ou tendo o seu esqueleto proteico formado por uma proteína transmembranar, da família do sindecam (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Os PGHS interagem com uma grande gama de proteínas da matriz extracelular, tendo assim um papel importante na estruturação dos tecidos (NIKITOVIC et al., 2014). Essa interação ocorre principalmente pela relação entre as cargas negativas do PGHS e as cargas positivas dos resíduos de aminoácidos das proteínas, ou pela afinidade entre essas moléculas (PGHS-proteínas) (SARRAZIN; LAMANNA; ESKO, 2011). O PGHS pode também se ligar a moléculas sinalizadoras, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e dessa maneira regular a sua atividade e modulando o encontro entre ligantes e receptores (BERNFELD et al., 1999).

As células endoteliais possuem principalmente um PGHS típico de membrana plasmática, o sindecam-4, e sua estrutura sacarídica foi investigada por Nader e colaboradores em 1987, sendo que os autores constataram que esse heparam sulfato é peculiar, porque exhibe características marcantes de heparina, intercaladas entre sequências sacarídicas de heparam sulfato, sendo conhecido como um copolímero de heparam sulfato e heparina. Os autores acreditam que essa

sequência de heparina seja uma forma de permitir a compatibilidade das células endoteliais com o sangue, impedindo que ocorra coagulação sanguínea na parede luminal do vaso.

2.4.4. PAPEL PROTETOR DOS GLICOSAMINOGLICANOS EM RELAÇÃO AO VENENO DA ARANHA-MARROM

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (SENE, 2009; NOWATZKI, 2009) investigando o papel protetor que a heparina e de fucanas (polissacarídeos sulfatados, obtidos de algas ou animais marinhos), sobre ação do veneno loxoscélico em células endoteliais de aorta de coelho em cultura, mostraram que, quando essas células foram tratadas com veneno, seguidas pelo tratamento com os polissacarídeos sulfatados, apresentaram menor desadesão celular, bem como menos alterações morfológicas, quando comparadas o grupo controle, previamente expostas ao veneno da aranha-marrom, sem adição de polissacarídeos (SENE, 2009).

Por outro lado, células de ovário de hamster chinês deficientes da biossíntese de glicosaminoglicanos (linhagem CHO-745, que sintetiza apenas 5%, quando comparada com as células selvagens - CHO-K1) quando expostas ao veneno da aranha-marrom foram mais susceptível a ação do veneno, tanto na alteração da morfologia, quanto na perda de adesão (NOWATZKI, 2009), o que sugere que glicosaminoglicanos pode ser protetor da ação do veneno.

Estes dados em conjunto, apontam que tratamentos com polissacarídeos sulfatados protegem as células ação do veneno e, os polissacarídeos sulfatados das células tem influência para redução o descolamento das células, causados pela ação do veneno, sugerindo que as células endoteliais podem possuir um protetor endógeno. Neste sentido destaca-se o PGHS, cuja estrutura sacarídea contém sequências da molécula de heparina.

Face ao exposto, este trabalho busca entender se o PGHS é a molécula que protege as células endoteliais da ação do veneno loxoscélico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do proteoglicano de heparam sulfato como possível protetor da ação do veneno da aranha-marrom sobre as células endoteliais da aorta de coelho.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o PGHS é capaz de minimizar as alterações morfológicas das células, quando expostas ao veneno de aranha-marrom.
- Verificar se o PGHS é capaz de diminuir a morte celular causada pelo efeito do veneno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO VENENO LOXOSCÉLICO

O veneno da aranha *Loxosceles intermedia* foi cedido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) ao Laboratório de Matriz Extracelular coordenado pelo Professor Dr. Silvio Sanches Veiga do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, e gentilmente disponibilizado para o nosso uso.

4.2. CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas as células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) (BUONASSISI, 1973), e uma linhagem de RAEC que possui deficiência de sindecam-4, um PGHS de superfície celular. Essa linhagem foi denominada de 10+ e foi obtida utilizando shRNA, pelo grupo de pesquisa da UNIFESP, coordenado pela Profa. Helena Nader (CAVALHEIRO et al., 2017).

As células foram cultivadas em meio F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fischer) e bicarbonato de sódio (1,18 g/L) (Thermo Fisher Scientific), contendo antibiótico, penicilina (10.000 U/ml), e estreptomicina (10.000 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific). Para as células 10+, além dos reagentes descritos acima, foi adicionado no meio de cultura higromicina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany), antibiótico para seleção das células, na concentração final de 100 µg/ml.

As células foram mantidas em incubadora de CO₂ (Series 8000 WJ CO₂ incubator Thermo Fisher Scientific, modelo 3429) com temperatura constante de 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Os subcultivos foram realizados quando as células atingiram a confluência. Para esse procedimento, as células primeiramente foram lavadas 3 vezes com EBSS (solução salina balanceada de Earl). Para soltar as células foi utilizada pancreatina diluída em EBSS (0,25% w/v), também conhecida como viocase (Sigma-Aldrich). As células endoteliais permaneceram sob a ação enzimática por 30 minutos. Após as células estarem soltas, foram transferidas para um tubo contendo F-12 e 10% de SFB e centrifugadas por 3 minutos a 1800 rpm. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em meio F-12 com 10% de SFB. As células foram contadas na câmara de Neubauer, e transferidas para garrafas (manutenção) ou placas (destinadas a experimentos).

4.3. AUMENTO DA EXPRESSÃO DO PGHS

Para obter células endoteliais que superexpressam PGHS, essas foram processadas como descrito em Porcionatto et al., (1998). Brevemente, as células foram plaqueadas (150.000 células por poço) em placas de 6 poços e cultivadas por 3 dias. 3 horas antes a exposição ao veneno, o meio de cultura foi substituído por F12 sem SFB contendo 100 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich).

4.4. ANÁLISE DE MORTE CELULAR

Para detectar a morte celular por apoptose, necrose ou apoptose tardia, foi utilizado o kit "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II" (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), que contém anexina V conjugada com FITC e 7-AAD (7-Aminoactinomycin D). A anexina V liga-se especificamente à fosfatidilserina (fosfolípido presente na face interna da membrana plasmática que é externalizado já na fase inicial da apoptose) e o 7-AAD, um intercalante de DNA que só consegue fazer a marcação se houver permeabilidade da membrana plasmática (isto é, em fase final da apoptose ou em necrose). A interpretação dos resultados se baseia na distinção de células em: a) condição normal (ausência de marcação); b) apoptose inicial (marcação positiva apenas para anexina V); c) apoptose tardia (marcação

positiva para anexina V e 7-AAD e d) necrose (marcação positiva apenas para 7-AAD).

Para tanto, RAEC (normal ou expostas ao PMA) e a 10+ foram cultivadas em placas de 6 poços e posteriormente foram expostas, ou não (controle), ao veneno de *L. intermedia* (40 µg/ml) por 24 horas. Após esse período, as células soltas foram coletadas e as aderidas foram removidas com a viocase (Sigma-Aldrich) diluída em EBSS e coletadas.

Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para lavagem, centrifugadas novamente, e incubadas com Anexina V e 7-AAD durante 15 minutos à 4° C. As amostras foram analisadas no equipamento FACSCalibur (Becton Dickison, Mountain View, CA, EUA), e os dados foram analisados no software *Flowing*.

4.5. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO VENENO SOBRE A MORFOLOGIA DAS CELULAS ENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO

Para analisar as células ao longo do tempo de exposição ao veneno, essas foram plaqueadas (150.000 células por poço) em uma placa de 6 poços (Sarstedt).

Após 3 dias em cultura, as células foram expostas, ou não (controle), ao veneno da *L. intermedia* (40 µg/ml) como descrito em (NOWATZKI, 2009; SENE, 2009). Após a exposição ao veneno, foi capturada a imagem de um campo de cada poço da placa nos tempos de 0, 6 e 24 horas no microscópio Leica DM IL LED, com a câmera Leica EC3, utilizando software LAS EZ (Leica).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados anteriores sugerem que o PGHS endotelial pode ser a molécula que protege essas células da ação direta do veneno loxoscélico. Para confirmar essa hipótese foram realizados um conjunto de experimentos com as células endoteliais em três condições diferentes, a saber: a) células normais; b) células que superexpressam PGHS e c) células com expressão reduzida de PGHS.

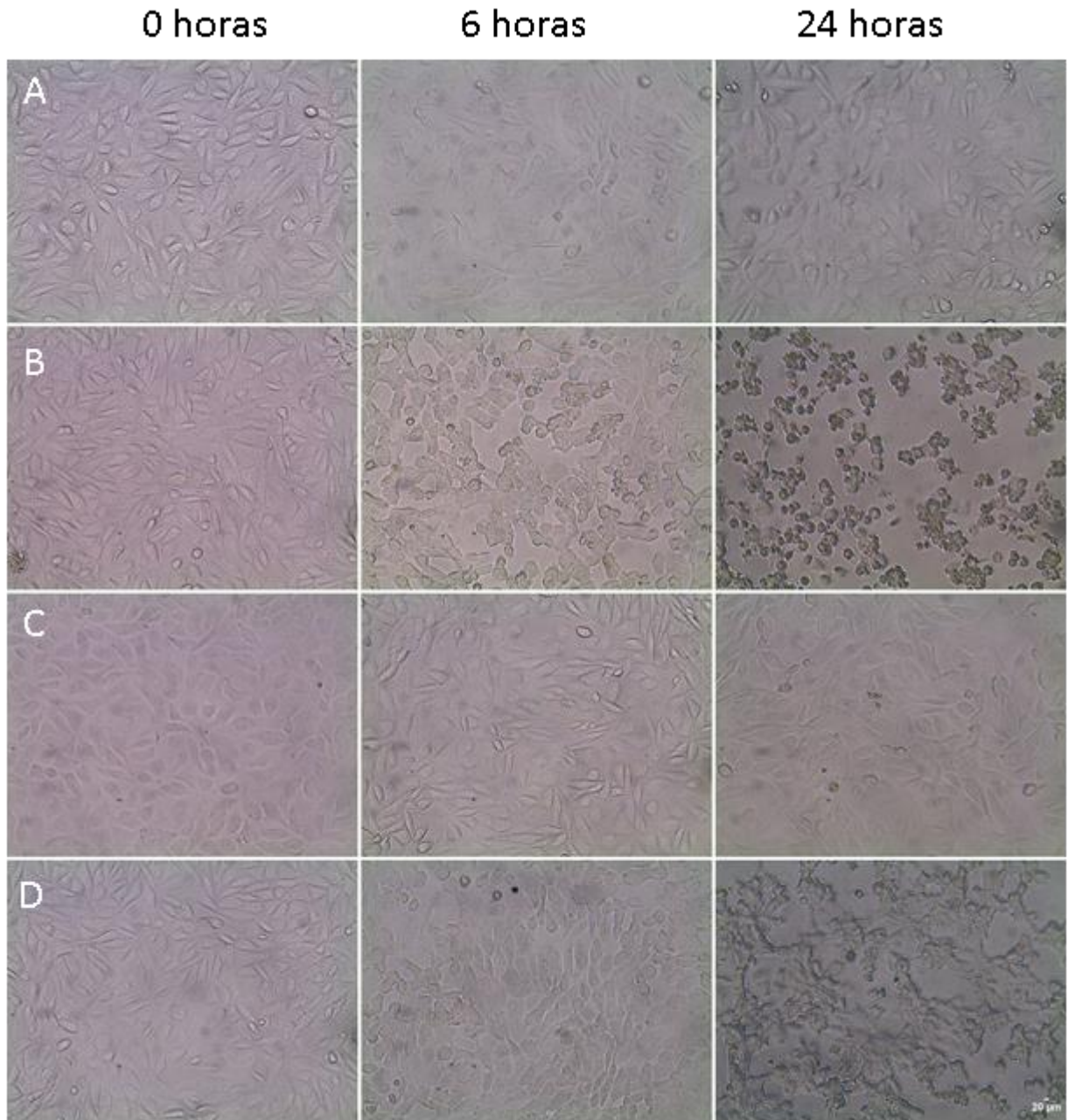
5.1. EFEITO DO VENENO DA ARANHA NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Para confirmar se PGHS pode proteger as células endoteliais, o primeiro passo foi avaliar se a superexpressão deste proteoglicano pode melhorar o efeito protetor. Para tanto, a síntese de PGHS foi estimulada como descrito por Porcionatto et al., (1998), e era esperado que essas células fossem menos suscetíveis a ação do veneno.

Ao analisar as células que superexpressam o PGHS após 6 horas de exposição ao veneno, quase não há alteração da morfologia celular, enquanto que nas células normais já é possível observar uma diminuição do contato célula-célula (FIGURA 4). No entanto, após 24 horas de exposição ao veneno loxoscélico, as células normais possuem uma alteração drástica na morfologia celular, onde é visível que praticamente todas as células já estão apresentando um formato arredondado. Por outro lado, as células que foram estimuladas para produzir mais PGHS apresentam uma alteração bem menor. Note que essa alteração, vista após 24 horas de exposição ao veneno, é comparável com as células normais que foram expostas por 6 horas, o que reforça a ideia de que o PGHS protege as células endoteliais. Vale salientar que não foi observada diferença na morfologia das células controle, e das células expostas somente ao PMA (ambas na ausência de veneno).

Já foi descrito na literatura que polissacarídeos sulfatados, como a heparina e fucanas diminuem a degradação da fibronectina pela ação do veneno (SENE, 2009), também sabe-se que o PGHS da célula endotelial possui sequências características de heparina em sua cadeia, sendo conhecido como um copolímero de heparam sulfato e heparina (Nader et al., 1987). Portanto, esses dados reforçam que o efeito protetor do PGHS da célula endotelial frente ao veneno da aranha-marrom, pode ocorrer devido a essa peculiaridade em sua estrutura sacarídica, para comprovar foi avaliada se as células estão viáveis.

FIGURA 4 - AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PGHS REDUZ A AÇÃO DO VENENO SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS



Células endoteliais foram expostas ao veneno (40µg/ml) por 24 horas diferentes tempos (0, 6 e 24 horas). **A**-Células controle **B**- Células expostas ao veneno **C**- Células expostas somente ao PMA **D**- Células expostas ao PMA e ao veneno. As células foram cultivadas até atingirem a confluência, foram lavadas com EBSS e expostas ao veneno, ou não (controles), durante 24h. As imagens foram obtidas por microscopia de luz na objetiva de 20x.

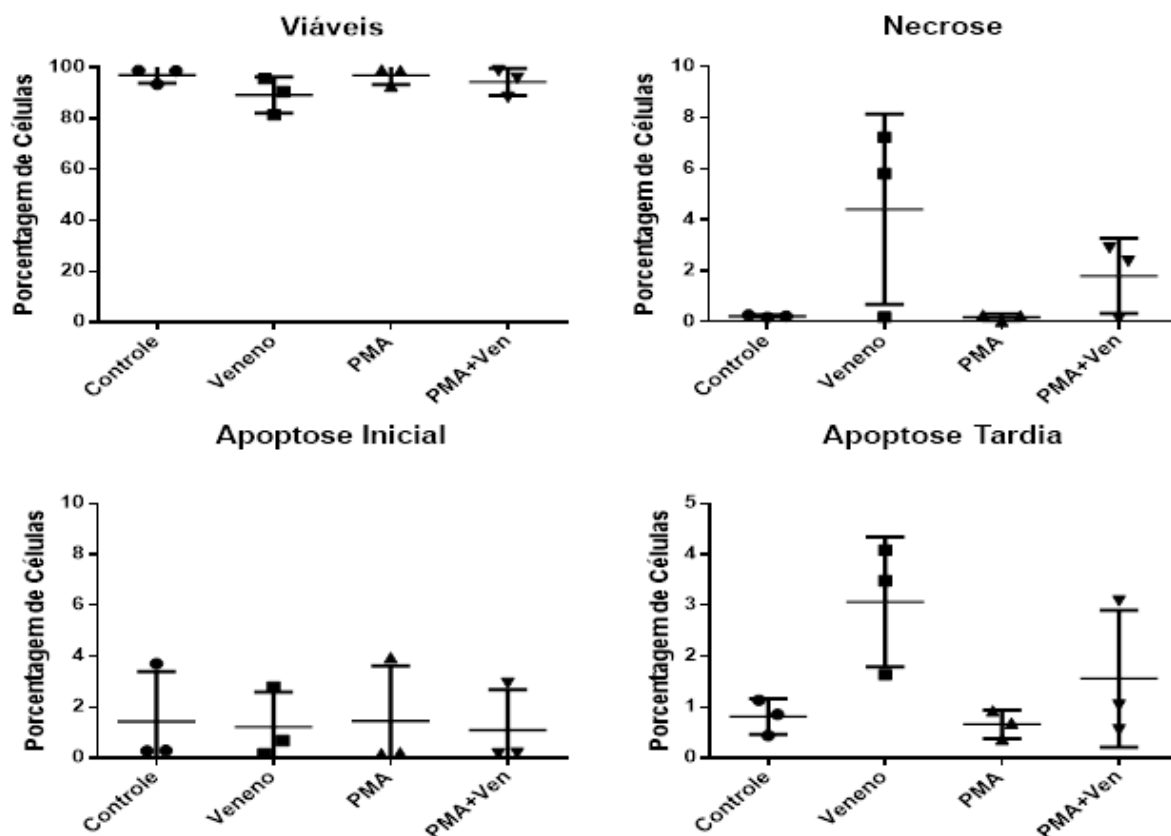
5.2. ANÁLISE DE MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS AO VENENO DA ARANHA-MARROM

Uma vez que as análises morfológicas sugerem um possível mecanismo protetor do PGHS contra a ação do veneno, o próximo passo foi avaliar a viabilidade das células. Como a grande maioria das células estavam ainda aderidas à placa, após 24h de tratamento com o veneno, esperava-se que a maioria das células estariam viáveis.

Como já foi descrito, o veneno da aranha-marrom, nas células endoteliais, age principalmente degradando a matriz extracelular (VEIGA et al., 2001b). Essa degradação causa a perda da adesão das células endoteliais, o que culmina em uma morte celular por *anoikis* (NOWATZKI et al., 2012).

Os resultados obtidos para avaliar a viabilidade celular estão descritos na Figura 5, que confirmaram o que era esperado, isto é, que não houve diferença da morte entre os diferentes tratamentos, uma vez que o PGHS produzido pelas células já protege-as. Com esses resultados também é possível verificar que o PMA por si só não causa uma toxicidade para as células.

FIGURA 5: AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS AO VENENO DA *L. Intermedia* POR 24H



Células endoteliais foram expostas ao veneno (40µg/ml) por 24 horas, após esse período as células foram preparadas para o ensaio de Anexina V/7-AAD, e os resultados foram obtidos por Citometria de

fluxo. Cada ponto representa um experimento independente. Análise estatística foi realizada por Mann-Whitney e não foi observado diferença estatisticamente significativa.

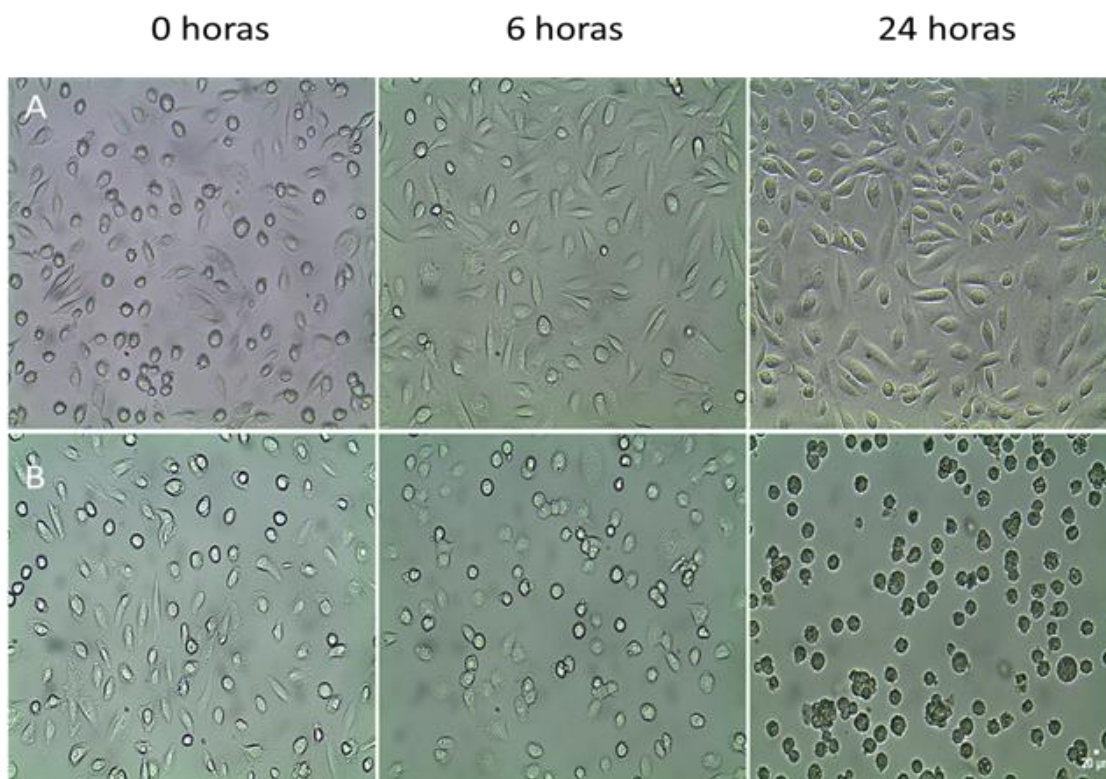
5.3. ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA PROVOCADA PELO VENENO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS DEFICIENTES DA EXPRESSÃO DE PGHS

Com o objetivo de comprovar se PGHS tem, realmente, papel protetor sobre a ação do veneno loxoscélico, o próximo passo foi avaliar a sua ação frente a células endoteliais com deficiência na biossíntese deste proteoglicano. Para tanto, foram utilizadas células deficientes de Sindecam-4, o PGHS característico das células endotéliais, obtido por Cavalheiro et al., 2017, onde os autores realizaram nas células RAEC um *knockdown* para este proteoglicano, por meio da técnica de shRNA, essa linhagem celular foi denominada 10+.

Assim, essas células foram expostas a 40 µg/ml de veneno e após 6h já é possível observar que as células já se encontravam arredondadas e com algumas células desaderidas (Figura 6). E em 24h as células expostas ao veneno estavam todas soltas.

Esse dado sugere que o PGHS, tem um papel essencial na adesão células-matriz extracelular, e pode reduzir a perda dessa adesão causada pela ação do veneno da *L. intermedia*. No entanto, o papel protetor sobre a ação direta do veneno loxoscélico foi avaliado sobre a capacidade das toxinas reduzirem a viabilidade das células endoteliais.

FIGURA 6: DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO DO SINDECAM-4 AUMENTA AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS PROVOCADAS PELO VENENO



Células endoteliais deficientes da expressão de sindecam-4 (10+) foram expostas ao veneno (40µg/ml) por 24 horas diferentes tempos (0, 6 e 24 horas). **A**-Células controle **B**- Células expostas ao veneno. As células foram cultivadas até atingirem a confluência, foram lavadas com EBSS e expostas ao veneno, ou não (controles), durante 24h. As imagens foram obtidas por microscopia de luz na objetiva de 20x.

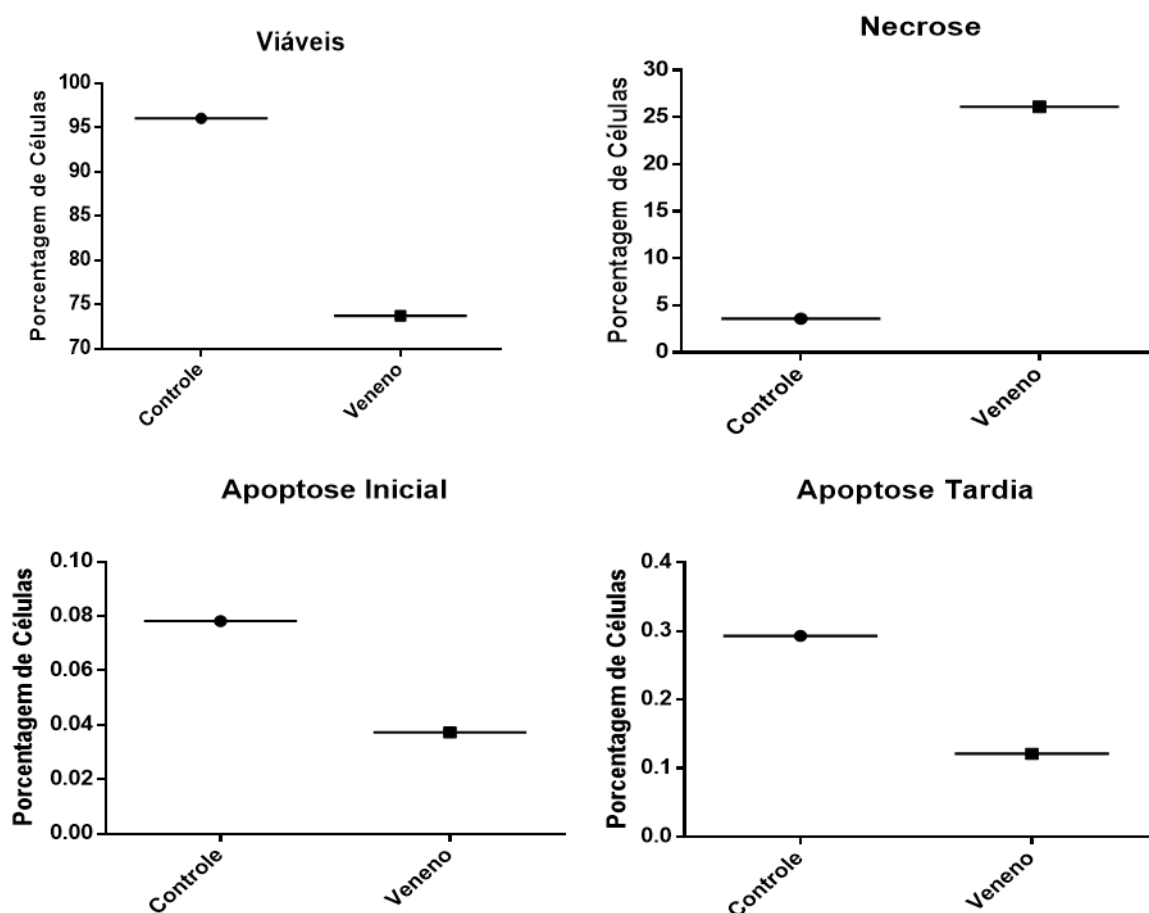
5.4. ANÁLISE DE MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO AO VENENO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS COM DEFICIÊNCIA NA EXPRESSÃO DE SINDECAM-4

Como descrito em Nowatzki et al., 2012, as células endoteliais expostas ao veneno, não sofrem ação direta, mas acabam morrendo por *anoikis*. Para confirmar que o Sindecam-4 tem um papel protetor que impede a ação direta do veneno nas células endoteliais, foi realizado o ensaio de Anexina V/7-AAD nas células 10+, tendo em vista que a Anexina V marca fosfatidilserina, um fosfolípido característico da face interna das membrana plasmática e é externalizado em apoptose inicial. Já o 7-AAD, como intercalante de DNA (a exemplo de outro, como o Iodeto de Propídeo) só consegue marcar o ácido nucléico se transpor a barreira da membrana plasmática, o que é alcançado em estágios de apoptose tardia ou necrose, uma vez que nestes casos a membrana plasmática apresenta poros (DONG, H. P. et al., 2009).

Na figura 7 pode se observar um grande aumento no número de células em necrose após 24h de exposição ao veneno. Apesar de ter sido realizado apenas uma vez esse ensaio, esse dado preliminar é extremamente promissor e

interessante, pois na ausência do Sindecam-4, as células endoteliais não só têm a sua morfologia alterada mais facilmente, como o veneno parece atuar diretamente nas células, e elas entram em um processo de morte por necrose, diferentemente do que ocorre com a linhagem selvagem de RAEC, que morre por *anoikis*, muito tempo depois da exposição ao veneno.

FIGURA 7: AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR APÓS A EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS COM DEFICIÊNCIA NA EXPRESSÃO DE SINDECAM-4 AO VENENO DA *L. intermedia* POR 24H



Células 10+ foram expostas ao veneno (40µg/ml) por 24 horas, após esse período as células foram preparadas para o ensaio de Anexina V/7-AAD, e os resultados foram obtidos por Citometria de fluxo. Análise estatística foi realizada por Mann-Whitney e não foi observado diferença estatisticamente significativa.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante a realização desse trabalho, surgiram vários problemas técnicos que acabaram atrasando a obtenção dos resultados, e não foi possível obter diferenças estatisticamente significativas. Apesar desse contraponto, os dados são promissores, e há uma tendência grande para que com trabalhos futuros seja possível confirmar que o PGHS realmente protege as células da ação do veneno *loxoscélico*.

Vale destacar que nosso objetivo inicial era seguir as células vivas e analisar em “time lapse”. No entanto, a ausência de CO₂ específico para este ensaio no microscópio confocal impediu a realização adequada deste ensaio, uma vez que sua ausência já levou as células a morte, mesmo na ausência do veneno. Este ensaio será realizado no próximo semestre, assim que chegar a mistura gasosa necessária.

Outro ponto interessante que poderá comprovar, definitivamente, se o PGHS é realmente fundamental como protetor nas células endoteliais, será a construção de células RAEC que produzam proteoglicano sem a porção sacarídica, o que será conseguido pelo uso de precursores sintéticos (xilosídeos), o que levará a célula produzir um proteoglicano somente com o esqueleto proteico. Este ensaio não foi possível ser realizado, tendo em vista que tivemos problemas de contaminação com as células endoteliais e esperamos muito tempo para reposição vinda da UNIFESP. Este ensaio está planejado para também para o início do próximo semestre e, com isto, fechamos o manuscrito.

7. CONCLUSÃO

- Tendo como base os resultados obtidos, é capaz de observar que o aumento da expressão do PGHS, as células não sofreram alterações drásticas na morfologia e diminui a perda de adesão célula-célula, quando as células são expostas a ação do veneno.
- A diminuição da expressão do PGHS da célula endotelial, o sindecam-4, aumenta os efeitos do veneno, que pode agir diretamente nas células, desencadeando um processo de necrose o que confirma a importância do PGHS para a proteção das células endoteliais

8. REFERÊNCIAS

- APPEL, M. et al. Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ**, v. 2, p. 152–158, 2005.
- BARAMOVA, E. N. et al. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 275, n. 1, p. 63–71, nov. 1989.
- BARBARO, K. C. et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 331–338, mar. 1992.
- BEDNASKI, A. V. et al. Characterization of Brown spider (*Loxosceles intermedia*) hemolymph: Cellular and biochemical analyses. **Toxicon**, v. 98, p. 62–74, maio 2015.
- BERNFELD, M. et al. Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 729–777, jun. 1999.
- BINFORD, G. J. et al. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 538–553, nov. 2008.
- CAVALHEIRO, R. P. et al. Coupling of vinculin to F-actin demands Syndecan-4 proteoglycan. **Matrix Biology**, jan. 2017.
- CHAIM, O. M. et al. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, n. 12, p. 309–344, 22 mar. 2011.
- CHAVANTE, S. F. et al. A novel heparan sulphate with high degree of N-sulphation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, n. 1, p. 49–57, mar. 2000.
- CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 6, 8 dez. 2017.
- COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 60, n. 12, p. 885–897, dez. 2012.
- DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, dez. 2004.
- DE OLIVEIRA, K. C. et al. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421–429,

mar. 2005.

DIAS-LOPES, C. et al. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 481–487, fev. 2010.

ESKO, J. D.; KIMATA, K.; LINDAHL, U. **Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

ESKO, J. D.; LINDAHL, U. Molecular diversity of heparan sulfate. **The Journal of clinical investigation**, v. 108, n. 2, p. 169–73, jul. 2001.

ESKO, J. D.; SELLECK, S. B. Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 435–471, 2002.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2, p. 139–149, abr. 2005.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261–267, out. 1992.

GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 72, n. 6, p. 455–482, dez. 2008.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins.

Toxicon, v. 83, p. 91–120, jun. 2014.

ILAN, N.; ELKIN, M.; VLODAVSKY, I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 12, p. 2018–2039, 2006.

IOZZO, R. V.; SAN ANTONIO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 3, p. 349–355, 1 ago. 2001.

IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 42, p. 11–55, mar. 2015.

JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiological reviews**, v. 71, n. 2, p. 481–539, abr. 1991.

KATO, D. et al. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. **Antiviral Research**, v. 88, n. 2, p. 236–243, nov. 2010.

- KUBASKI, F. et al. Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 1–2, p. 67–77, jan. 2017.
- LEE, D. H.; OH, J.; CHUNG, J. H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 3, p. 174–181, set. 2016.
- LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International wound journal**, v. 12, n. 3, p. 313–6, jun. 2015.
- LIMA, M.; RUDD, T.; YATES, E. New Applications of Heparin and Other Glycosaminoglycans. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 749, 6 maio 2017.
- LOPES, C. C.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 39, n. 2, p. 157–67, fev. 2006.
- MALAUQUE, C. M. S. et al. Loxosceles and Loxoscelism: Biology, Venom, Envenomation and Treatment. In: **Spider Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. v. 17p. 1–22.
- MINISTÉRIO DA, S. **DATASUS Tecnologia da Informação a Serviço do SUS**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/animaisPR>>. Acesso em: 19 jun. 2017.
- NIKITOVIC, D. et al. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2471–2481, ago. 2014.
- NOWATZKI, J. **Células Endoteliais Expostas Ao Veneo de L. intermedia São Induzidas à Apoptose Pelo Desalojamento Celular (Anoikis) Sendo Que a Ação Direta Das Toxinas é Inibida Pelo Proteoglicano De Heparan Sulfato**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2009.
- NOWATZKI, J. et al. Brown spider (Loxosceles intermedia) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 396–405, set. 2012.
- PACE, L. B.; VETTER, R. S. Brown recluse spider (Loxosceles reclusa) envenomation in small animals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 4, p. 329–336, ago. 2009.
- PALUDO, K. S. et al. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 844–853, jun. 2006.

- PALUSSON, M. Basement Membrane Proteins: Structure, Assembly, and Cellular Interactions. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 1–2, p. 93–127, 26 jan. 1992.
- PAVELIEV, M. et al. HB-GAM (pleiotrophin) reverses inhibition of neural regeneration by the CNS extracellular matrix. **Scientific Reports**, v. 6, p. 33916, 2016.
- POMIN, V. H. Sulfated glycans in inflammation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 353–369, mar. 2015.
- PORCIONATTO, M. A et al. Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA. **Journal of cellular biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 563–72, 15 set. 1998.
- SAMS, H. H. et al. Necrotic arachnidism. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 4, p. 561-73–6, abr. 2001.
- SARRAZIN, S.; LAMANNA, W. C.; ESKO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, p. 1–33, 1 jul. 2011.
- SCHAEFER, L.; SCHAEFER, R. M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 237–246, 10 jan. 2010.
- SENE, R. V. DE. Polissacarídeos Sulfatados Minimizam Os Efeitos Do Veneno De Aranha Marrom (Loxosceles Intermedia) Em CéLulas Endoteliais. 2009.
- SHASTRI, M. D. et al. Non-anticoagulant derivatives of heparin for the management of asthma: distant dream or close reality? **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 3, p. 357–73, 3 mar. 2014.
- SILVEIRA, A. L. New geographic records of the brown spider *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Sicariidae) in Northeastern Brazil and its medical importance. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 1, p. 37–45, 2015.
- SOARES, M. A. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans May Promote or Inhibit Cancer Progression by Interacting with Integrins and Affecting Cell Migration. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 213–221, maio 2006.
- VEIGA, S. S. et al. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis research**, v. 102, n. 3, p. 229–37, 1 maio 2001a.
- VEIGA, S. S. et al. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom

toxins. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 34, n. 7, p. 843–50, jul. 2001b.

VETTER, R. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. **Dermatology online journal**, v. 5, n. 2, p. 7, 16 nov. 1999.